

破壁灵芝孢子粉对人肺癌细胞超微结构影响及抑制作用

汤莹¹ 韩森^{2#} 沈亚峰¹ 吕高建³ 范晓燕¹ 雷长海¹ 张玉霞¹ 杨勇骥^{1△}

(1 第二军医大学基础部生物物理学教研室, 上海 200433; 2 南京中科集团股份有限公司, 南京 210008;
3 华东理工大学材料科学与工程学院, 上海 200237)

摘要 目的:观察破壁灵芝孢子粉对人肺癌细胞(A549 细胞)超微结构的影响及对生长的抑制作用。方法:选取 A549 细胞并采用离体实验研究破壁灵芝孢子粉对肺癌细胞的作用。利用透射电镜研究破壁灵芝孢子粉对 A549 细胞超微结构的影响;利用 CCK-8 研究破壁灵芝孢子粉对 A549 细胞生长的抑制作用;利用乳酸脱氢酶(LDH)研究破壁灵芝孢子粉对细胞膜通透性的影响。结果:透射电镜观察显示破壁灵芝孢子粉可进入 A549 细胞,细胞中线粒体出现肿胀等现象;10 mg/ml 破壁灵芝孢子粉可导致大量 A549 细胞肿胀、崩解。CCK-8 检测结果显示破壁灵芝孢子粉导致 A549 细胞的存活率明显下降。LDH 检测显示破壁灵芝孢子粉可使 A549 细胞的 LDH 释放量明显增加,且存在浓度依赖关系。结论:破壁灵芝孢子粉对人肺癌细胞具有显著抑制作用。
关键词 破壁灵芝孢子粉; 肺癌; A549 细胞; 透射电镜

Ganoderma lucidum spore powder induces ultrastructural changes and growth inhibition in human lung cancer cells

Tang Ying¹, Han Sen^{2#}, Shen Yafeng¹, Lv Gaojian³, Fan Xiaoyan¹, Lei Changhai¹, Zhang Yuxia¹, Yang Yongji^{1△}

(1. Department of Biophysics, Second Military Medical University, Shanghai 200433;
2. Nanjing Zhongke Group Corp. Ltd., Nanjing 210008; 3. Material Science and Engineering Institute, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract Objective: To study Ganoderma lucidum spore powder induced growth inhibition and ultrastructural changes in human lung cancer cells (A549 cells). **Methods:** The *in vitro* A549 cells were used to study the effect of Ganoderma lucidum spore powder on human lung cancer cells. A549 cells were incubated with Ganoderma lucidum spore powder for 4h. The ultrastructure of A549 cells was observed by transmission electron microscopy. The viability of A549 cells was studied by cell counting kit (CCK-8) test. The membrane permeability of A549 cells was studied by lactate dehydrogenase (LDH) cytotoxicity assay. **Results:** The A549 cells phagocytosed Ganoderma lucidum spore powder, had mitochondrial swelling, and even led to a large number of A549 cell swelling and disintegration in 10 mg/ml concentration of Ganoderma lucidum spore powder. Ganoderma lucidum spore powder led to a significant decrease in the viability of A549 cells, and an obvious increase in LDH release of A549 cells. And there was a concentration-dependent relationship. **Conclusion:** Ganoderma lucidum spore powder has a significant inhibitory effect on the human lung cancer cells.
Key words Ganoderma lucidum spore powder; lung cancer; A549 cells; transmission electron microscopy

近年来,肺癌的发病率和死亡率均明显升高。其病因主要与长期吸烟、大气污染等因素有关。灵芝是担子菌纲多孔科真菌灵芝的子实体,是一种药用真菌。灵芝孢子粉是灵芝成熟期从子实体的菌盖释放出的孢子。有文献研究报道破壁灵芝孢子粉具有抗肿瘤、增强免疫等功效^[1-4],但有关破壁灵芝孢子粉对肺癌细胞抑制作用研究的报道较少。本研究利用透射电镜和分

子生物学技术研究破壁灵芝孢子粉对人肺腺癌细胞系—A549 细胞超微结构的影响以及抑制作用,初步探讨破壁灵芝孢子粉抗肺癌的作用。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

破壁灵芝孢子粉由南京中科药业有限公司提供;细胞培养基(DMEM)为 Gibco 公司产品;胎牛血清(FBS)购自杭州四季青生物工程材料有限公司;胰蛋白酶购于上海博光生物科技有限公司;实验室的器具耗材购买于赛默飞世尔公司;CCK-8 试剂盒购于同仁化学有限公司;乳酸脱氢酶(LDH)检测试剂盒购于碧云天生物技术研究;血浆购于长海医院。

doi: 10.3969/j.issn.1001-1633.2015.01.006
第 1 作者 E-mail: ty1205@163.com
共同第 1 作者 E-mail: 61012530@qq.com
△通讯作者, E-mail: yjyang22@163.com
收稿日期: 2014-07-17; 修回日期: 2014-10-23

1.2 细胞培养及处理

A549 细胞(人肺腺癌细胞),由武汉大学中国典型培养物保藏中心购得。A549 细胞复苏后,用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基(加青霉素 100 IU/ml,链霉素 100 μg/ml)在 37℃,5%CO₂ 的细胞培养箱中培养。细胞生长至密度约 70%时,用 0.25%胰酶消化传代,继续培养至细胞的对数生长期时进行实验。实验组在培养基中分别加入终浓度为 5、10 mg/ml 和 15 mg/ml 的破壁灵芝孢子粉,以不加破壁灵芝孢子粉的细胞为空白对照组,共孵育 4 h。

1.3 透射电镜检测

A549 细胞与各浓度组的破壁灵芝孢子粉共孵育 4 h 后,用 0.1 mol/L PBS 溶液漂洗 3 次,将细胞刮取收集,加入 4%多聚甲醛和 4%戊二醛等容混合固定液,4℃固定过夜。0.1 mol/L PBS 溶液漂洗 3 次,每次 15 min,用戊二醛和血浆使细胞凝成团块状。将细胞团块切成小块(1 mm×1 mm×1 mm),经 0.1 mol/L PBS 溶液漂洗过夜,1%锇酸后固定。梯度乙醇、丙酮脱水,浸透后用环氧树脂 Epon812 包埋,聚合,用超薄切片机(Leica-UC6,德国)进行超薄切片,经铀-铅双重染色后,在透射电镜(H-7650,日本)下观察细胞超微结构并记录观察结果。

1.4 细胞存活率检测

采用 CCK-8 试剂盒检测细胞的存活率。A549 细胞接种于 96 孔板,接种密度为每孔 100 μl MEM 中 5×10³ 个细胞,培养 24 h 后,加入不同浓度破壁灵芝孢子粉孵育 4 h,然后在每孔加入 10 μl WST-8 溶液,在二氧化碳孵箱中继续孵育 45 min。最后用酶标仪(Synergy 2, Biotek, USA)在 450 nm 波长处检测各组溶液的吸光度。各实验组与对照组相比,其结果取与对照组的比值。

1.5 LDH 活性检测

将处于对数生长期的 A549 细胞以 5×10⁴/ml 密度接种于 96 孔板中,每孔 180 μl,每个浓度组设 5 个复孔,培养 24 h 后,加入不同浓度破壁灵芝孢子粉孵育 4 h,并设阴性和空白对照组。然后在 96 孔板离心机上以 400 g 离心 5 min,取上清液 120 μl 加入到新的 96 孔板中,每孔加入 60 μl LDH 工作液,用铝箔避光包裹放到摇床上摇 30 min。利用酶标仪测定吸光度,测定波长为 490 nm,参考波长为 600 nm。根据吸光度值计算不同浓度组 A549 细胞的 LDH 活性。

1.6 统计学处理

所有实验数据均采用 SPSS 16.0 软件统计处理,均值用 $\bar{x} \pm s$ 表示,单因素方差(one-way ANOVA)分析组间 MTT 的 OD 值有无差异。

2 结果

2.1 破壁灵芝孢子粉的形态

破壁灵芝孢子粉的形态见图 1。透射电镜观察显

示灵芝孢子粉结构均不完整,表明其均处于破壁状态。

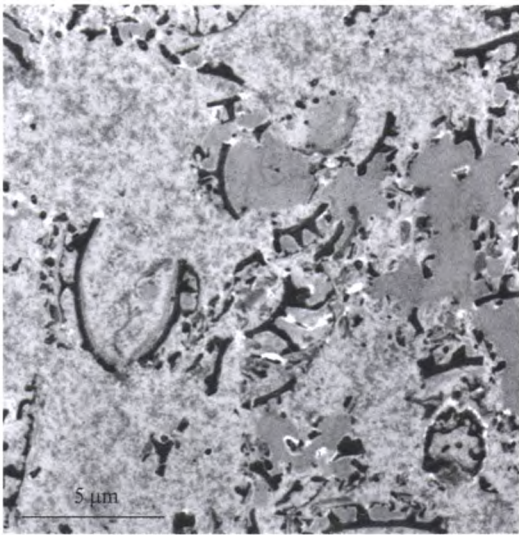


图 1 破壁灵芝孢子粉的形态结构,标尺=5 μm
Fig 1 Morphological structure of ganoderma lucidum spore powder, bar=5 μm

2.2 破壁灵芝孢子粉对 A549 细胞超微结构的影响

利用 TEM 观察破壁灵芝孢子粉与 A549 细胞共孵育 4 h 后对细胞超微结构的影响,结果如图 2 所示。电镜下可见对照组中 A549 细胞呈长梭形,线粒体结构正常,无肿胀(图 2A)。实验组中,少量 A549 细胞吞噬灵芝孢子的碎片,灵芝孢子在细胞中存在于膜性小泡中(图 2B)。细胞中线粒体出现肿胀。较高浓度破壁灵芝孢子粉组中可见大多数细胞出现肿胀、崩解现象(图 2C、D)。随着浓度进一步升高,细胞崩解的数量明显增多。

2.3 破壁灵芝孢子粉对 A549 细胞生长的抑制作用

A549 细胞与不同浓度的破壁灵芝孢子粉(5、10、15 mg/ml)共孵育 4 h,结果(图 3)显示破壁灵芝孢子粉在 5 mg/ml 开始对 A549 细胞产生明显的毒性,随着破壁灵芝孢子粉浓度的增加,细胞存活率明显下降。在 5 mg/ml 实验组中细胞存活率仅为对照组的 50%左右。

2.4 破壁灵芝孢子粉对 A549 细胞膜完整性的影响

LDH 在胞质内含量丰富,正常时不能通过细胞膜,当细胞受损或死亡时可释放到细胞外。因而 LDH 检测结果可以反映细胞膜的损伤情况,是细胞毒性评价的敏感指标。A549 细胞与不同浓度的破壁灵芝孢子粉共孵育 4 h 后 LDH 释放的结果显示,各浓度组的破壁灵芝孢子粉均可导致 A549 细胞的 LDH 释放,且存在浓度依赖关系。相对于空白对照组,5 mg/ml 实验组中 A549 细胞 LDH 的释放量明显增高,大于 40%,差异有统计学意义($P<0.01$,图 4)。

3 讨论

肺癌是一种恶性肿瘤。近年来,随着环境污染的加剧,肺癌的发病率和死亡率也呈不断增高的趋势,严重威胁人类健康。目前肺癌是全世界肿瘤致死的主要

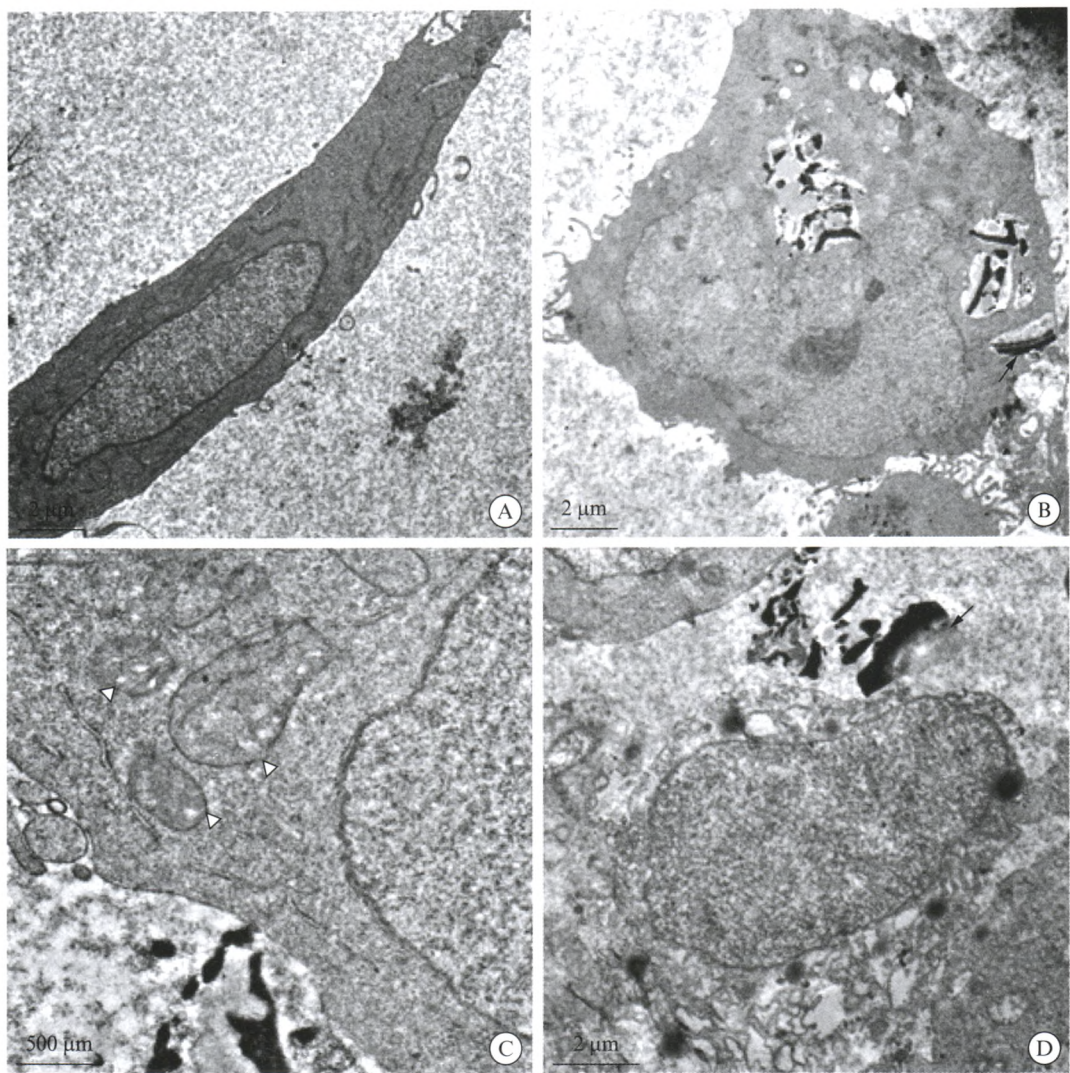


图2 破壁灵芝孢子粉进入 A549 细胞的透射电镜图像

Fig 2 TEM images of ganoderma lucidum spore powder in A549 cells

A: The control group of A549 cells, bar=2 μ m; B: A549 cells phagocytosed fragments of ganoderma lucidum spore powder, bar=2 μ m; C: Mitochondrial swelling in A549 cell, bar=500 nm; D: Swelling and disintegration of A549 cells, bar=2 μ m. $\uparrow$: Ganoderma lucidum spore powder; $\triangle$: Mitochondria

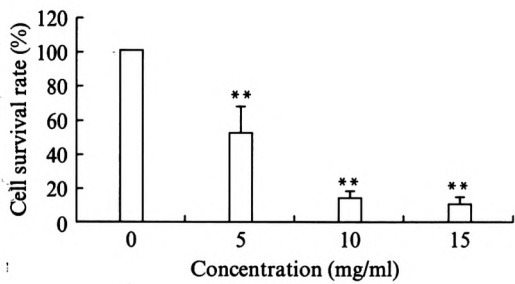


图3 不同浓度的破壁灵芝孢子粉对 A549 细胞存活率的影响

Fig 3 Cell viability of A549 cells exposed to different concentrations of ganoderma lucidum spore powders

** $P < 0.01$ vs control

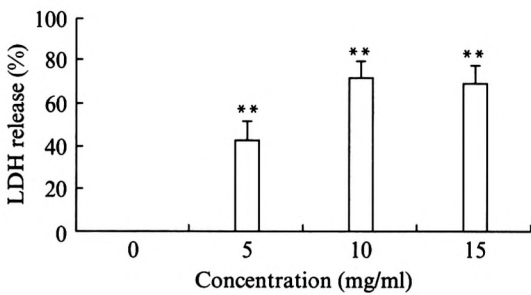


图4 不同浓度的破壁灵芝孢子粉对 A549 细胞 LDH 的影响

Fig 4 LDH of A549 cells exposed to different concentrations of ganoderma lucidum spore powders

** $P < 0.01$ vs control

原因之一,非小细胞肺癌是肺癌的常见类型之一,且预后较差,5 年生存率仍很低^[5-7]。因此,对于肺癌的预防和治疗一直是医疗工作者关注的热点。

灵芝孢子是灵芝成熟后释放出的生殖细胞,含有多糖、三萜类、蛋白质、肽类、氨基酸、脂肪、腺嘌呤核苷及微量元素等有效成分。具有抗氧化、抗病毒、降糖降脂、免疫调节和抗肿瘤等多种生物学活性。破壁灵芝

孢子粉可增加灵芝的有效生物活性物质的释放,提高机体的免疫力^[4,8]。

本研究所用的灵芝孢子粉呈破壁状态,透射电镜下几乎未见到完整的灵芝孢子。有文献报道,灵芝孢子可通过调节免疫功能来抑制肿瘤细胞的生长和增殖,甚至杀伤肿瘤细胞^[9]。而本实验通过透射电镜观察显示破壁灵芝孢子粉对 A549 细胞的超微结构具有

直接破坏作用。同时,结果显示除了少数 A549 细胞中吞噬有破壁灵芝孢子的部分结构外,其他细胞中均未见灵芝孢子,而在损伤严重的 A549 细胞周围均可见破壁灵芝孢子粉,表明对 A549 细胞造成损伤的主要因素可能是灵芝孢子内所含活性成分释出后的作用。王静等^[3]报道灵芝提取物对离体肿瘤细胞存在抑制作用。杨巍等^[10]报道灵芝制剂可提高 Lewis 肺癌模型小鼠免疫系统的活性,增强机体的抗肿瘤免疫功能。完整的灵芝孢子由于其致密外壳的保护,其内部的有效活性成分不能释出而无法作用于细胞。潘鸿辉等^[2]研究提出破壁灵芝孢子粉有助于灵芝孢子释放出有效的活性成分,提高对肿瘤细胞的抑制作用。

CCK-8 检测结果显示破壁灵芝孢子粉对 A549 细胞的生长均有抑制作用。5 mg/ml 破壁灵芝孢子粉与 A549 细胞共孵育 4 h,就可导致细胞存活率降为对照组的 50%左右。LDH 检测结果也显示 5 mg/ml 破壁灵芝孢子粉对 A549 细胞膜造成较严重的损伤,导致 LDH 的释放量明显增加。随着浓度增加,破壁灵芝孢子粉对人肺腺癌细胞 A549 细胞的存活抑制作用进一步加强。吕明明等^[11]也报道灵芝孢子油对肺腺癌癌性胸水中原代肿瘤细胞有抑制作用,并与肿瘤化疗药物(多西紫杉醇、顺铂、健择等)的抗肿瘤作用无明显差异。

以上研究结果表明破壁灵芝孢子粉可造成 A549 细胞超微结构明显损伤,甚至崩解;对人肺腺癌细胞 A549 细胞有明显抑制作用,且存在浓度依赖性。其作用机制还需进一步研究。本实验结果为破壁灵芝孢子

粉应用于肺癌的治疗提供了实验依据,具有积极意义。

参考文献

[1] 陈雪华,朱正刚,马安伦,等. 灵芝孢子粉对荷 HAC 肝癌小鼠抗肿瘤的试验性研究[J]. 上海免疫学杂志,2000,20(2): 101-103.

[2] 潘鸿辉,谢意珍,李向敏,等. 灵芝孢子对肿瘤细胞生长的抑制效果研究[J]. 中国食用菌,2010,29(5): 33-36.

[3] 王静,吴松青. 灵芝孢子粉抗肿瘤的试验研究[J]. 中外健康文摘医药月刊,2008,5(1): 88-91.

[4] 张荣标,陈润,陈冠敏,等. 破壁灵芝孢子粉对小鼠免疫功能影响的研究[J]. 预防医学论坛,2013,19(12): 936-938,954.

[5] Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics,2010[J]. CA Cancer J Clin, 2010,60(5): 277-300.

[6] Verdeehia A, Franeisei S, Brenner H, et al. Recent cancer survival in Europe: a 2000-02 period analysis of EUROcare-4 data[J]. Lancet Oncol, 2007,8(9): 784-796.

[7] Li S G, Chen H Y, OuYang C S, et al. The efficacy of Chinese herbal medicine as an adjunctive therapy for advanced non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. PLoS One, 2013,8(2): e52604.

[8] 黄晓兰,吴惠勤,黄芳,等. 破壁与不破壁灵芝孢子粉多糖的分析[J]. 中草药,2006(6): 813-816.

[9] 吴珍珠. 灵芝孢子抗肿瘤的机制[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2006,22(6): 836-837.

[10] 杨巍,张英林,牛坤伟,等. 灵芝精粉与灵芝孢子粉对 Lewis 肺癌模型小鼠免疫功能的影响[J]. 中国生物制品学杂志,2012,25(9): 1171-1175.

[11] 吕明明,王婷婷,钱倩,等. 灵芝孢子油对肺腺癌癌性胸水中原代肿瘤细胞的抗肿瘤作用[J]. 现代肿瘤医学,2011,19(7): 1289-1292.

(编辑:王 栋)

江苏省解剖学会遗体捐献工作推进会在南京召开

2014 年江苏省解剖学会率先增设了“遗体捐献工作委员会”。2014 年 12 月 28 日在南京医科大学召开了“江苏省解剖学会遗体捐献工作推进会”,这是全国解剖学界第一个此类专题会议。参会代表来自江苏省 15 所医学院校解剖学科和相关部门、部分城市红十字会和南京市红十字会捐献遗体志愿者之友。江苏省红十字会副会长徐国林和南京医科大学副校长张竹繁专程参加本次会议。

徐国林副会长分析了目前江苏省遗体捐献工作的现状,并认为本次会议的召开将对江苏省器官及遗体捐献工作开展起积

极的推动作用。研讨会上,江苏省解剖学会理事长丁炯教授作了题为“医学院校在遗体捐献工作中角色作用”的主题报告。与会代表就学校所在城市遗体捐献工作成功的经验和存在的问题以及各医学院校相关工作的现状及对策进行了交流和研讨。一致认为,医学院校不仅是遗体捐献工作的执行者和受益者,更应积极、有效地发挥其多重角色作用。

本次会议的召开将对江苏省各地区的遗体、器官捐献和医学教育工作的良性和协调发展产生积极的推动作用。

江苏省解剖学会